Univ. Exchange NOV 23 Lane Medical Library

UNIVERSITÉ DE LAUSANNE
Institut de Physiologie, Prof. Dr M. Arthus

Sur un procédé permettant de reconnaître et doser quelques DIASTASES PROTÉOLYTIQUES

THÈSE

présentée à la Faculté de Médecine de l'Université de Lausanne pour l'obtention du grade de Docteur en Médecine

PAR

Aziz SARWAT

LAUSANNE
IMPRIMERIE DU LÉMAN (S. A.), JUMELLES, 3
1927

UNIVERSITÉ DE LAUSANNE
Institut de Physiologie, Prof. Dr M. Arthus

Sur un procédé permettant de reconnaître et doser quelques DIASTASES PROTÉOLYTIQUES

THÈSE

présentée à la Faculté de Médecine de l'Université de Lausanne pour l'obtention du grade de Docteur en Médecine

PAR

Aziz SARWAT

LAUSANNE
IMPRIMERIE DU LÉMAN (S. A.), JUMELLES, 3
—
1927

UNIVERSITE DE LAUSANNE

FACULTÉ DE MÉDECINE

La Faculté de Médecine de l'Université de Lausanne, sans se prononcer sur les opinions du candidat et ensuite des rapports favorables de **MM.** les professeurs ARTHUS et STRZYZOWSKI, autorise l'impression de la thèse intitulée :

Sur un procédé permettant de reconnaître et doser quelques diastases protéolytiques

présentée par M. Aziz Sarwat pour l'obtention du grade de Docteur en Médecine.

LAUSANNE, le 13 juillet 1927.

Pour le Doyen :

Le Vice-Doyen,

MAURICE ARTHUS

Sur un procédé permettant de reconnaître et doser quelques DIASTASES PROTÉOLYTIQUES

PAR

Aziz SARWAT

(Travail fait à l'Institut de Physiologie de l'Université de Lausanne)

On possède depuis fort longtemps des procédés divers plus ou moins exacts, qui permettent de reconnaître, en une liqueur de l'organisme ou en un tissu, la présence de diastases protéolytiques. C'est tout d'abord pour révéler la pepsine du suc gastrique, ou la trypsine du suc pancréatique, qu'on les a imaginés.

On peut, par exemple, faire agir la liqueur supposée peptique (après l'avoir acidulée à 4 pour 1000, si elle n'est pas elle-même acide, ou si son acidité est inférieure à cette valeur) sur des flocons de fibrine, ou sur des cubes de blanc d'œuf coagulé. La pepsine est révélée par la dissolution de ces matières. Hammarsten, dans son traité de Chimie Physiologique, appelle l'attention du lecteur sur la nécessité de prendre quelques précautions, pour éviter, dans ces essais, de commettre quelque erreur. Pour les liqueurs faiblement peptiques, il recommande de préférer la fibrine, plus facilement attaquée, au blanc d'œuf coagulé, plus résistant, et inversement, pour les liqueurs très riches en pepsine. Il recommande d'user de fibrine de bœuf et non de fibrine de porc, cette dernière se dissolvant assez facilement dans une liqueur acide sans pepsine, la première ne se dissolvant que si la pepsine est présente. D'ailleurs, on peut user de fibrine coagulée par la chaleur à la température d'ébullition; mais

elle est beaucoup plus résistante à l'action de la pepsine que la fibrine crue, et ne diffère pas beaucoup alors du blanc d'œuf coagulé.

On pourrait encore faire agir la liqueur acide supposée peptique sur une solution de gélatine, à la température ordinaire : sous l'influence de la pepsine, la gélatine donne des gélatoses, non-gélifiables par refroidissement. Il est d'ailleurs nécessaire de faire comparativement l'essai sur la gélatine avec la liqueur supposée peptique et la même liqueur bouillie en vase clos (pour détruire éventuellement la pepsine et conserver l'acide), parce que l'acide seul peut transformer la gélatine en gélatoses (mais beaucoup moins vite que la pepsine de même acidité).

Pour manifester la trypsine pancréatique, on peut user de procédés analogues, et, comme cette diastase agit en milieu neutre, et mieux encore en milieu alcalinisé par le carbonate de soude, on ne risque pas ici de transformer la substance protéique-réactif par quelque élément autre que la trypsine. Une liqueur tryptique dissout des flocons de fibrine, ou crue ou cuite, et aussi des cubes de blanc d'œuf coagulé ; elle prive une solution de gélatine de son pouvoir de gélification, en la transformant en gélatoses. Par degrés de sensibilité à l'action tryptique, nous pouvons ranger ces substances dans l'ordre suivant : gélatine, fibrine crue, fibrine cuite, blanc d'œuf coagulé.

La trypsine pousse la protéolyse jusqu'à production (50 pour 100 environ des protéines sont ainsi transformées) d'acides aminés, parmi lesquels il en est de peu solubles, la leucine, par exemple, et plus encore la tyrosine. Si l'essai est pratiqué à l'aide de flocons de fibrine, mis en suspension dans la liqueur soumise à l'examen, la tyrosine finit par se déposer en petites masses blanchâtres d'apparence sphérique, qui, à l'examen microscopique, se présentent comme formées d'aiguilles cristallines, radialement disposées. On pourrait encore révéler la tyrosine non précipitée en ajoutant un extrait de Russules, qui contient, comme on sait, une diastase, dite tyrosinase, capable, en présence de l'oxygène atmosphérique, de transformer la tyrosine en une matière noire, colorant fortement la liqueur.

De tels essais nécessitent quelques précautions. Il faut, par exemple, éliminer toute intervention possible de micro-

bes, car ceux-ci sont aptes à sécréter de la trypsine, et il importe de ne pas prendre pour trypsine préformée dans la liqueur de la trypsine de néo-formation microbienne. Aussi ajoute-t-on à la liqueur un antiseptique. Jadis les expérimentateurs ont largement usé de thymol, mais cette substance ne semble pas capable de réaliser une aseptie parfaite. Puis on a saturé la liqueur de chloroforme, mais il est assez difficile d'assurer la saturation et surtout de la maintenir. Mieux vaut fluorer le mélange à 1 pour 100. Le fluorure de sodium, à cette concentration, ne s'oppose pas à l'action de la trypsine (il s'oppose au contraire à l'action de la pepsine), et il suspend toute manifestation vitale microbienne, notamment la sécrétion de la diastase protéolytique.

Quant à l'érepsine du suc intestinal, elle peut être révélée par la transformation en amino-acides de protéoses, et, comme parmi ces amino-acides il peut y avoir de la tyrosine, les derniers procédés indiqués ci-dessus, pour la trypsine, sont évidemment applicables à sa manifestation. Ici encore l'emploi d'antiseptiques, et notamment de fluorure de sodium, est indispensable.

Pour mettre en évidence la trypsine ou l'érepsine d'une liqueur, nous proposons un nouveau procédé, qui est d'une extrême simplicité et qui donne de bons résultats. Il consiste à faire agir la liqueur supposée protéolytique (mais non pas pourtant les liqueurs peptiques) sur une solution fluorée de caséum, et à reconnaître les modifications d'apparence et de précipitabilité de cette solution.

Dans un travail, publié comme thèse de Doctorat ès Sciences physiques, en 1893 (*Recherches sur quelques substances albuminoïdes. La Classe des Caséines, la Famille des fibrines.* Thèse de la Faculté des Sciences de Paris), le professeur Maurice Arthus a étudié les solutions salines de la caséine et de son dérivé, le caséum, engendré par l'action du labferment sur la caséine. De ces recherches nous retiendrons ce qui suit :

Les caséines (caséine et caséum) sont solubles dans les solutions aqueuses de fluorure de sodium, d'oxalate d'ammoniaque ou d'oxalate de potasse (contenant de 1 à 5 pour 100 de sel), et non pas seulement dans les solutions aqueuses d'alcalis ou de carbonates d'alcalis. Les solutions de caséines dans les solutions de sels et en particulier dans les solutions

de fluorure de sodium à 1 pour 100, peuvent être bouillies sans précipiter leur caséine. Elles sont précipitées par l'acide acétique, et, pour une proportion convenable d'acide, totalement précipitées. Elles sont d'ailleurs précipitées aussi, et totalement précipitées par le sulfate de magnésie dissous à saturation à froid. Le chlorure de sodium dissous à saturation ne les précipite pas à froid, mais les précipite totalement à la température d'ébullition. Ajoutons que ces solutions fluorées de caséines sont des liqueurs possédant une très belle opalescence.

Si l'on fait agir une liqueur tryptique sur la solution fluorée de caséine, il se produit, plus ou moins vite, un changement facilement appréciable : l'opalescence diminue et finit par disparaître, en même temps que se forme un dépôt floconneux très léger, qui flotte dans les parties inférieures de la liqueur. La liqueur, séparée par filtration sur papier de ces flocons, ne précipite plus par l'acide acétique : elle renferme des caséoses au lieu de la caséine primitive.

On pourra, par suite, juger de la présence d'une diastase protéolytique, ou d'un agent protéolytique dans un tissu ou une liqueur de l'organisme en les faisant agir sur une solution de caséine et en suivant les transformations subies par celle-ci, s'il s'en produit quelqu'une. On conclura à la présence de l'agent protéolytique si la liqueur perd son opalescence, ou si un dépôt floconneux s'y forme, ou si le précipité produit par l'acide acétique diminue ou même ne se forme plus.

Il n'est pas nécessaire de décrire les essais divers que nous avons faits pour fixer les meilleures conditions de préparation de la solution fluorée de caséum, etc. Nous nous bornerons à indiquer les données pratiques qui nous ont paru les plus recommandables.

Nous faisons tiédir du lait à une température de 30 à 40 degrés environ ; nous lui ajoutons de la présure en solution dans l'eau, et nous agitons avec des baguettes de verre, jusqu'à ce que se produise la précipitation du caséum. Grâce à cette agitation, le caséum ne se dépose pas en une gelée fragile, qu'il serait très difficile de laver, mais en grumeaux, englobant les éléments gras du lait. On serre la masse des grumeaux entre les doigts, sous courant d'eau, de façon à en expulser le liquide laiteux qu'ils retiennent et on continue tant que ce liquide présente quelque opalescence.

On jette alors ces grumeaux dans une solution aqueuse de fluorure de sodium à 1 pour 100, par exemple (ou 2 ou 4 pour 100, si l'on veut) et on porte à l'ébullition. On maintient l'ébullition 20 à 30 minutes, en ajoutant de temps en temps un peu d'eau, pour remplacer celle qui s'évapore (on pourrait avantageusement faire cette ébullition dans un vase à condensation de vapeur et à retour de l'eau condensée). On jette sur un filtre pour retenir les grumeaux non dissous et on obtient la solution fluorée de caséum sous les apparences d'une liqueur très opalescente.

Il est préférable de préparer cette solution de caséum et non une solution de caséine, telle qu'elle se pourrait séparer du lait par addition de 2 à 3 pour 1000 d'acide acétique, parce que, dans le traitement ultérieur du précipité par la liqueur fluorée, on libérerait les globules gras enclos dans la caséine et qu'ils se mettraient en émulsion dans la liqueur fluorée ; tandis qu'en usant du caséum, obtenu suivant les indications précédentes, on n'a pas cet ennui, les globules gras demeurant immobilisés dans la partie des grumeaux qui ne se dissout pas.

La solution fluorée de caséum est d'ailleurs conservée pendant quelques jours au repos avant de servir comme réactif des diastases protéolytiques, et la très petite quantité de globules gras qu'elle retient se réunit en une couche à la surface, ce qui permet de l'éliminer totalement.

La solution fluorée doit contenir au moins 1 pour 100 de fluorure de sodium, afin qu'aucune transformation microbienne ne s'y produise : le fluorure de sodium, en effet, à cette concentration, s'oppose aux manifestations vitales de tout microbe; mais on peut, si l'on veut, user sans inconvénient de liqueurs plus fortement fluorées, contenant par exemple 2, 3, 4 pour 100 de sel.

Quand on conserve pendant très longtemps la solution fluorée de caséum à la température du laboratoire (des semaines et des mois), on en peut voir aisément la transformation : elle perd son opalescence ; un précipité floconneux s'y produit et l'acide acétique ne la précipite plus. C'est ce phénomène, jadis décrit par Dastre, sous le nom de digestion saline des protéines, que le professeur Arthus a observé dans le cas des caséines. C'est la même transformation qui nous révélera, dans un liquide de l'organisme, la présence d'une diastase protéolytique. Mais nous ne risquons pas de commet-

tre une erreur, puisque cette digestion saline ne se produit que très tardivement, si tardivement que la confusion ne saurait être possible, même si l'essai, dont nous parlons, demandait une à deux semaines pour être réalisé.

Au lieu de préparer une solution fluorée, nous aurions pu préparer une solution oxalatée. Toutes choses se seraient passées d'identique façon. Il aurait suffi, pour assurer l'asepsie des liqueurs oxalatées de les soumettre à l'action de la température de 120 degrés à l'autoclave, et cela eut été nécessaire car les oxalates ne sont pas antiseptiques comme le sont les fluorures. Le fluorure de sodium présente l'énorme avantage de permettre d'opérer avec des liqueurs qui sont et demeurent aseptiques même si on opère en vases ouverts, non préalablement stérilisés, et cela simplifie les manipulations infiniment.

A un certain volume de cette solution fluorée de caséum, 20 centimètres cubes par exemple, on ajoute une quantité convenable (d'après la richesse supposée en agent protéolytique) de la liqueur soumise à l'essai, préalablement fluorée à ce même titre que la solution de caséum (1 pour 100 au moins) ; et on abandonne ce mélange soit à la température du laboratoire, soit à l'étuve à 40 degrés. On observe, après 24, 48 heures ou plus, les mélanges, afin d'y pouvoir reconnaître d'abord la diminution, puis la disparition de l'opalescence, puis le dépôt des flocons ci-dessus signalés. Ces diverses manifestations témoignent de la présence d'une diastase protéolytique dans la liqueur.

A titre de vérification, on peut comparativement faire agir sur un même volume de la solution fluorée de caséum un même volume de la liqueur soumise à l'essai et de cette même liqueur préalablement plongée pendant 15 minutes dans un bain-marie bouillant. La diastase protéolytique est révélée par la succession des transformations ci-dessus indiquées de la liqueur contenant la liqueur non-bouillie et par l'absence de transformations dans l'autre mélange.

Comme exemples de l'emploi de ce procédé, nous rapporterons nos observations dans deux séries d'essais.

On a admis que la désintégration des protéines dans les cellules vivantes se fait par dédoublements successifs de la molécule complexe et que l'agent de ces décompositions enchaînées est représenté par une diastase (ou par une série

de diastases) protéolytique (quelques auteurs ont même ajouté présentant quelque analogie avec la trypsine ou avec l'érepsine). Mais la démonstration n'en a pas été faite, à notre connaissance.

Nous avons recherché si les macérations de tissus divers sont capables de manifester une diastase protéolytique, agissant sur les solutions fluorées de caséum.

Nous avons fait des macérations de divers organes, muscles, foie, poumon, cœur, rein, testicule, duodénum, estomac, pancréas. Les tissus ont été pressés sous courant d'eau, pour que soit éliminé le plus possible le sang qu'ils contenaient. Puis ils ont été finement hachés avec des ciseaux, et mis en suspension dans deux fois leur poids d'eau salée à 1 pour 100. La macération s'est faite, à la température de 8 à 10 degrés, pendant 16 heures ; puis les liqueurs ont été séparées par filtration sur papier et ensuite fluorées à 1 pour 100 (3 volumes de la liqueur de macération et 1 volume de solution de fluorure de sodium à 4 pour 100). A 20 centimètres cubes de la solution fluorée de caséum ont été ajoutés 20 centimètres cubes des macérations fluorées des tissus divers ; et les mélanges ont été maintenus 8 jours au laboratoire à une température d'environ 16 à 18 degrés.

Au bout de 48 heures, les mélanges contenant du pancréas ou du duodénum avaient perdu leur opalescence ; dans les jours suivants, le précipité floconneux s'y est montré, augmentant progressivement de quantité. Dans aucun des autres mélanges, nous n'avons observé aucun changement. Les liqueurs pancréatique ou duodénale ne précipitent plus que faiblement par l'acide acétique ; les autres liqueurs précipitent abondamment. (Rappelons que la pepsine contenue dans le mélange gastrique ne saurait se révéler ici pour deux raisons : nos liqueurs ne sont pas acidulées, et la pepsine n'agit qu'en présence d'acide ; nos liqueurs sont fluorées et la pepsine n'agit pas en présence de fluorure de sodium.)

D'où nous concluons que les divers tissus de l'organisme (sauf le pancréas et le duodénum) ne contiennent pas de diastase protéolytique, capable de transformer le caséum en caséoses, donc ne contiennent ni trypsine ni érepsine. Si ces tissus renferment quelque diastase protéolytique, celle-ci diffère nécessairement des diastases digestives.

La méthode que nous proposons se prête aux recherches quantitatives approximatives des diastases protéolytiques du type trypsine-érepsine.

Supposons que nous nous proposions de comparer l'action protéolytique de diverses liqueurs. Nous en ajoutons des quantités égales à un même volume de la solution fluorée de caséum, et après les avoir abandonnées pendant un temps déterminé, convenablement choisi, à elles-mêmes, nous rechercherons la quantité de caséum non encore transformé en caséoses, ou si l'on veut précipitable par l'acide acétique.

Supposons que nous nous proposions de rechercher l'influence exercée par quelque variation des conditions de milieu. Nous ferons agir sur un même volume de la solution fluorée de caséum un même volume de la liqueur diastasique en présence des substances aptes à l'influencer, ou dans les diverses conditions dont on se propose de connaître le rôle possible.

Nous avons fait, pour fixer la valeur de ce procédé, quelques essais que nous allons résumer :

I. — Nous avons recherché si, par l'acide acétique, on précipite toujours la totalité du caséum dissous dans le fluorure de sodium, quelle que soit la concentration de la liqueur fluorée.

Nous préparons les mélanges suivants :

A. Solution de caséum dans le fluorure à 2 pour 100.
B. » » 1 »
C. » » ½ »

tous ces mélanges contenant la même quantité de caséum dans un même volume :

A. Solution caséum fl. à 2 % 1 vol. Eau fluorée 2 % 3 vol. Eau 0 vol.
B. » » 1 vol. » 1 vol. » 2 vol.
C. » » 1 vol. » 0 vol. » 3 vol.

A chacun de ces mélanges, nous ajoutons un égal volume d'acide acétique à 1 pour 100 (le mélange est ainsi acidifié à ½ pour 100). Les précipités sont jetés sur des filtres tarés, lavés à l'eau, desséchés à 110 degrés, jusqu'à poids constant, puis pesés.

Nous avons trouvé, opérant sur 20 centimètres cubes de la solution de caséum primitif :

A. 238 milligrammes.
B. 239 »
C. 236 »

nombres que nous pouvons considérer comme identiques.

Dans un second essai, nous avons trouvé, avec une autre solution de caséum, un peu moins riche :

a. 186 milligrammes.
b. 184 »
c. 187 »

II. — Nous avons recherché, si, par l'acide acétique, on précipite toujours la totalité du caséum dissous dans le fluorure de sodium, quelle que soit la richesse de la liqueur en caséum.

Nous avons préparé les liqueurs suivantes :

M. 20 cc. solut. de caséum fl.		
N. 20 cc.	»	20 cc. sol. aq. fluorure 2 %.
P. 20 cc.	»	40 cc. »

Nous avons ajouté à chacune de ces liqueurs un égal volume d'acide acétique à 1 pour 100, soit respectivement 20, 40, 60 centimètres cubes.

Nous avons, comme ci-dessus, séparé le précipité par filtration sur papier, puis nous l'avons lavé, desséché à 110 degrés à poids constant et pesé.

Nous avons trouvé les chiffres suivants :

M. 241 milligrammes.
N. 240 »
P. 246 »

Dans un second essai, nous avons obtenu, pour des mélanges équivalents :

m. 184 milligrammes.
n. 188 »
p. 182 »

III. — Nous avons recherché quelle pouvait être l'influence exercée par les produits de la protéolyse du caséum sur la précipitabilité de celui-ci par l'acide acétique.

Nous avons fait agir sur une solution fluorée (à 2 pour 100 de fluorure de sodium) de caséum une solution fluorée de pancréatine, et, quand la liqueur fut devenue non-opalescente,

nous avons filtré. De cette liqueur, nous avons ajouté des proportions variées, comme il est indiqué au tableau suivant, à un même volume de la solution fluorée de caséum.

En fait, nous avons employé des produits de protéolyse plus ou moins profonde, en faisant la préparation de ces produits à l'aide de solutions plus ou moins diluées de pancréatine, agissant pendant le même temps sur une même solution fluorée de caséum. Nous les désignerons par les lettres A. B. C., la liqueur A. étant celle qui renferme le plus de pancréatine et la liqueur C. étant celle qui en renferme le moins.

a.	20 cc.	sol. fl. Cas.	20 cc.	liq.	*A.*	0 cc.	sol. aq. fl. de sod.
b.	20 cc.	»	10 cc.	»	*A.*	10 cc.	» »
c.	20 cc.	»	5 cc.	»	*A.*	15 cc.	» »
d.	20 cc.	»	20 cc.	»	*B.*	0 cc.	» »
e.	20 cc.	»	10 cc.	»	*B.*	10 cc.	» »
f.	20 cc.	»	5 cc.	»	*B.*	15 cc.	» »
g.	20 cc,	»	20 cc.	»	*C.*	0 cc.	» »
h.	20 cc.	»	10 cc.	»	*C.*	10 cc.	» »
i.	20 cc.	»	5 cc.	»	*C.*	15 cc.	» »

Voici les poids de caséum desséché à 110 degrés, qu'on précipite de ces liqueurs par addition d'un même volume d'acide acétique à 1 pour 100.

a.	124	milligrammes.
b.	125	»
c.	125	»
d.	126	»
e.	124	»
f.	123	»
g.	123	»
h.	125	»
i.	128	»

qu'on peut considérer comme étant constants.

IV. — Nous avons fait des mélanges de notre solution fluorée à 2 pour 100 de caséum avec une solution fluorée à 2 pour 100 de peptone de Witte à 1 pour 100.

m.	25 cc.	sol. de cas. fl.		25 cc.	sol. pept.	0 cc.	eau.
n.	25 cc.	»	»	20 cc.	»	5 cc.	»
p.	25 cc.	»	»	15 cc.	»	10 cc.	»
q.	25 cc.	»	»	10 cc.	»	15 cc.	»
r.	25 cc.	»	»	5 cc.	»	20 cc.	»

Nous avons obtenu :

m. 156 milligrammes.
n. 154 »
p. 153 »
q. 155 »
r. 154 »

C'est dire que nous ne notons pas de différences.

V. — Nous avons recherché si des quantités plus ou moins grandes de chlorure de sodium dans les mélanges influence la précipitabilité par l'acide acétique du caséum non transformé en caséoses.

Nous avons préparé les mélanges suivants :

U.	20 cc.	sol. fl. cas.	20 cc.	eau salée à 2 %	0 cc.	eau dist.
V.	20 cc.	»	15 cc.	»	5 cc.	»
X.	20 cc.	»	10 cc.	»	10 cc.	»
Y.	20 cc.	»	5 cc.	»	15 cc.	»
Z.	20 cc.	»	0 cc.	»	20 cc.	»

Nous avons obtenu les résultats suivants :

U. 126 milligrammes.
V. 124 »
X, 123 »
Y. 124 »
Z. 123 »

VI. — Enfin, nous avons introduit de la glycose.

a.	20 cc.	sol. fl. cas.	20 cc.	sol. fl. glyc.	0 cc.	eau dist.
b.	20 cc.	»	15 cc.	»	5 cc.	»
c.	20 cc.	»	10 cc.	»	10 cc.	»
d.	20 cc.	»	5 cc.	»	15 cc.	»
e.	20 cc.	»	0 cc.	»	20 cc.	»

Nous avons obtenu :

a. 124 milligrammes.
b. 121 »
c. 125 »
d. 123 »
e. 124 »

De cet ensemble d'essais, nous pouvons conclure qu'aucun des agents que nous avons étudiés ne modifie la précipitabilité du caséum par l'acide acétique et que ces agents ne peuvent

jouer aucun rôle perturbateur dans l'essai pratique, tel que nous le concevons.

Nous avons recherché s'il ne serait pas possible de simplifier l'analyse, en substituant à la méthode par pesées un autre procédé, par exemple la détermination de l'épaisseur de la couche du précipité, après qu'elle s'est tassée pendant un certain temps, comme on procède dans la détermination de la quantité de l'albumine urinaire par la méthode d'Esbach. Sans doute, la filtration du précipité se fait toujours très bien et rapidement ; son lavage ne demande pas grand temps ; mais il faut dessécher longuement à l'étuve à 110 degrés, vérifier qu'on a atteint la constance de poids et peser assez exactement, en tous cas au milligramme. Rien en tout cela n'est difficile, mais cela demande quelque temps.

Malheureusement, les choses ne se sont pas passées conformément à nos espérances. Si l'on fait, par exemple, la précipitation dans une série de tubes à essais, les précipités ne se déposent pas semblablement dans les divers tubes. Ici, le précipité descend rapidement et totalement ; là, une partie importante demeure en suspension ; ailleurs, une fraction flotte près de la surface ; ailleurs encore, de nombreux flocons restent adhérents aux parois du tube.

Nous avons essayé d'obtenir plus de similitude en centrifugeant ; mais ici encore, nous avons été déçu : de nombreux flocons restent adhérents aux parois des tubes, au moins quand on utilise une centrifugeuse de dimension modeste donnant 2000 tours environ par minute.

Nous avons donc renoncé à simplifier la méthode et nous en sommes revenus à la détermination par pesées. Ce n'est que dans le cas où les différences sont très grandes entre les liqueurs pour les quantités de caséum non encore transformé qu'on peut se contenter d'apprécier le plus ou moins grand volume du précipité par simple inspection.

Nous avons appliqué ce procédé à la recherche de la richesse en érepsine de la muqueuse intestinale entre le pylore et le caecum chez le lapin.

Un lapin ayant été sacrifié par hémorragie pratiquée à la carotide primitive, nous avons enlevé l'intestin grêle en toute son étendue ; nous l'avons lavé en faisant circuler un courant d'eau dans son intérieur, de la partie supérieure à la

partie inférieure. Puis nous en avons prélevé 9 échantillons successifs, aux divers étages, de 5 centimètres chacun : à savoir, un premier échantillon duodénal immédiatement au-dessous de l'abouchement du canal cholédoque ; un second à 20 centimètres au-dessous du premier, et ainsi de suite de 20 en 20 centimètres, le troisième correspondant à cette partie de l'intestin située au delà mais non loin de l'orifice du canal pancréatique. Ces fragments d'intestin ont été incisés suivant une génératrice et chacun d'eux a été immergé dans 20 centimètres cubes d'une solution fluorée de caséum, le tout étant maintenu au laboratoire à une température de 15 à 18 degrés environ. Au bout de 4 jours, nous avons déterminé par précipitation par l'acide acétique la quantité de caséum non transformé en caséoses, en prélevant pour l'analyse 10 centimètres de la liqueur. Nous avons obtenu les résultats suivants : Les numéros correspondent aux segments successifs de l'intestin dans l'ordre de leur situation sur le vivant. Le numéro 10 correspond à la solution de caséum non traitée par l'intestin.

Numéro	1	2	milligrammes
»	2	40	»
»	3	50	»
»	4	58	»
»	5	60	»
»	6	68	»
»	7	68	»
»	8	68	»
»	9	68	»
»	10	68	»

De ces chiffres, on peut tirer cette conclusion que seules les premières parties de l'intestin renferment de l'érepsine en notable quantité. Au delà de l'orifice du canal pancréatique, on n'en trouve plus que des traces. Au delà de la moitié de l'intestin, on n'en trouve plus.

Une seconde recherche faite suivant le même plan a donné des résultats identiques.